

# Generación de gemelos homocigóticos por bipartición embrionaria en bovinos

Cortez P., J.V.<sup>(2)</sup>, Murga V., N.L.<sup>(1, 2)</sup> y Cayo C., I.S.<sup>(1, 2)</sup>

## Resumen

En la naturaleza, la bipartición embrionaria ocurre de manera espontánea en menos del 1% de los casos. Este suceso puede ser realizado mecánicamente en estadios avanzados de desarrollo embrionario, con el uso de micromanipuladores. El presente trabajo tuvo como objetivo; evaluar el estadio embrionario óptimo para la bipartición de embriones (sin el uso de micromanipuladores). Para este trabajo se utilizaron 10 embriones producidos in vivo por la técnica de superovulación (SOV), cinco mórulas y cinco blastocistos de calidad excelente, los cuáles fueron divididos manualmente en medio de manipulación. Luego de la división, los embriones fueron cargados a pajuelas con medio de manipulación, para ser transferidos a vacas receptoras previamente sincronizadas. Se confirmaron tres preñeces dobles con embriones en estadio de mórula a los 35 días luego de la transferencia. En conclusión, la producción artificial de gemelos homocigóticos puede realizarse aún en condiciones de campo a partir de embriones en estadio de mórula. Futuros trabajos que incluyan un mayor número de embriones, deberán confirmar los resultados preliminares obtenidos en este experimento.

**Palabras clave:** homocigóticos; bipartición; superovulación; microcuchilla; embrioblasto.

## Generation of homozygous twins by embryo bipartition in cattle

### Summary

In nature, embryo bipartition occurs spontaneously in less than 1% of cases. This event can be performed mechanically in advanced stages of embryonic development through the use of micromanipulators. This study aimed; evaluating optimal for bipartition embryonic stage embryo (without the use of micromanipulators). For this work 10 embryos produced in vivo by the technique of superovulation (SOV), five morulae blastocysts five excellent quality, which were divided manually handling means were used. After the division, the embryos were loaded straws with handling means, to be transferred to previously synchronized recipient cows. Three twin pregnancies with embryos in morula stage confirmed 35 days after the transfer. The artificial production of homozygous twins can still be performed under field conditions from embryos in morula stage.

Future studies involving larger numbers of embryos, will be needed to confirm the preliminary results obtained in this experiment.

**Keyword:** homozygous; bipartition; superovulation; microblade; embryoblast.

(1) Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), Perú.

(2) Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología, IGBI, Perú.

Taurus Año 17; N° 68:

Recibido: 18 de agosto de 2015.

Aceptado: 17 de septiembre de 2015.

## Introducción

La presión económica y de conservación en la producción animal requiere que los avances tecnológicos en embriología sigan haciendo mejoras en la previsibilidad y la eficiencia en la utilización de embriones <sup>(4)</sup>.

Entre las biotecnologías reproductivas que mayor atención han recibido están la superovulación, transferencia embrionaria, criopreservación de gametos y embriones, cultivo *in vitro* de embriones, así como la micromanipulación embrionaria (bipartición embrionaria) con fines investigativos, o de mejora genética. La bipartición de embriones de mamíferos y el aislamiento de blastómeros es una técnica muy útil para generar gemelos o múltiplos. Se han visto gemelos idénticos de varias especies a la largo de la historia y el avanzado en las últimas décadas a una variedad de aplicaciones en la medicina veterinaria y humana es muy importante <sup>(6)</sup>. La micromanipulación en mamíferos con fines de producir gemelos idénticos se realiza en estadios tempranos del embrión <sup>(9)</sup>. Al presente, existe variación en la micromanipulación embrionaria empleada en animales de granja y/o de laboratorio, para producir gemelos genéticamente idénticos <sup>(8)</sup>, siendo la más importante, la partición embrionaria por microcirugía y la separación y cultivo de blastómeros aislados por métodos enzimáticos y mecánicos <sup>(1,10)</sup>. Sin embargo, a pesar de que las técnicas vienen desarrollándose desde hace décadas, aún no se cuenta con resultados óptimos, ni con información que pueda ser replicada sin un equipamiento sofisticado. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el estadio embrionario óptimo (mórula o blastocisto) para la bipartición de embriones en condiciones de campo, sin el uso de micromanipuladores. Sugiere la posibilidad de usarla como herramienta para lograr múltiples beneficios tales como la obtención de material biológico, incremento del porcentaje de preñez, el progreso genético, entre otros.

## Materiales y métodos

### Evaluación y selección de receptoras

Se evaluó visualmente y con entrevista al ganadero las condiciones sanitarias óptimas, edad (2-10 años), número de partos (0-8 partos) y condición corporal (2,5-4), y luego contrastar con ecografía para descartar preñez y anomalías; al mismo tiempo, se clasificaron según los cruces.

### Sincronización de celo de receptoras

Las receptoras fueron sometidas a un protocolo de sincronización de estro, donde el día cero se aplica progesterona 1,38 gr (CIDR<sup>®</sup>, Pfizer) más benzoato de estradiol 2 mg (Estovet<sup>®</sup>, Montana); día cinco se aplica prostaglandina F<sub>2α</sub> como luteolítico 25 mg (Lutalyse<sup>®</sup>, Pfizer) más 400 UI de EcG (Folligon<sup>®</sup>, Intervet); día ocho se retira la progesterona, el día nueve se aplica 1 mg de benzoato de estradiol con la finalidad de sincronizar la ovulación, día diez las receptoras presentan estro, día 17 se realiza la transferencia de embriones.

### Colecta de embriones

La colecta se realizó a los siete días de la primera inseminación artificial, utilizando la técnica que a continuación se detalla. Primero se dilata la cérvix para luego fijar el catéter foley en el cuerno derecho y posterior en el izquierdo se realiza el lavado de cada cuerno utilizando medio de colecta (BioLife<sup>™</sup>, Agtech), el medio evacuado va al filtro (Zona<sup>™</sup> Filter, Agtech) donde son retenidas las estructuras; acabado el proceso de colecta el filtro es llevado al laboratorio donde es depositado en placas Petri de 100 mm, para posterior realizar la búsqueda.

### Búsqueda y clasificación de embriones

Se realizó mediante un estereoscopio (Nikon MZ 745 - Aleman), a un aumento de 20X, todas las estructuras halladas son trasladadas a una placa de 35 mm la cual contiene medio de mantenimiento (SYNGRO<sup>®</sup>, Bioniche, Canadá) para posteriormente acabada la búsqueda realizar la clasificación según la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones IETS (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los embriones, según estado de desarrollo y calidad embrionaria (IETS, 2010; <sup>7</sup>).

Estado de desarrollo	Código
Ovocito no fertilizado-UFO	1
Mórula compacta	4
Blastocisto temprano	5
Blastocisto	6
Blastocisto expandido	7
Blastocisto eclacionado	8
Calidad embrionaria	Código
Excelente	1
Bueno	2
Regular	3
Degenerado	4

### **Bipartición de los embriones**

Del grupo de embriones, se seleccionó embriones en estadios de mórula y blastocisto, ambas de condición excelente (la clasificación fue realizada acorde a la clasificación propuesta por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones) <sup>(7)</sup>. Los embriones fueron transferidos una placa de 60mm donde contiene gotas de 20 ul con medio de micromanipulación compuesta por TCM-Hepes suplementado con 30% de suero fetal bovino (SFB), donde ambos fueron bipartidos con ayuda de una ultra Sharp splitting blades (BIONICHE, USA). La bipartición fue realizada considerando mitades exactas del macizo celular de la mórula y el embrioblasto para el caso del blastocisto. Las mitades fueron transferidos al medio SOF <sup>(12)</sup>, suplementado con 0,4 mM piruvato de sodio, 0,2 mM de L- glutamina, 1X de aminoácidos esenciales y no esenciales, 10 ng/mL de EGF, 2% de SFB, 0,1 mg/mL de ácido cítrico, 0,5 mg/mL de myo-Inositol y 0,3% de albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos, los reactivos usados de la marca SIGMA. Posteriormente, las mitades de la mórula fueron transferidos a una pajueta de 0,25 cc (lo mismo fue realizado con las mitades del blastocisto) para poder ser transferidos a dos vacas receptoras Aberdeen Angus de dos años de edad, previamente sincronizadas <sup>(2)</sup>. La confirmación de la preñez se realizó a los 35 días con un equipo de ultrasonido (Esaote, Italia).

### **Transferencia de embriones**

Para la transferencia de los embriones, se ubica el cuerpo lúteo por palpación (CL > 16 mm), lo que indicaba ser apta como receptora de embrión; Teniendo los embriones ya identificados según registro y calidad se realizó las transferencias utilizando una pistola de transferencia de embriones (21") con fundas punta de acero (Agtech, USA) cubierta con camiseta sanitaria, donde la pistola es dirigida al cuerno lipso lateral del CL funcional, para que el embrión sea depositado en el tercio craneal del cuerno uterino.

### **Diagnóstico de preñez**

Se realizó después de 28 a 35 días de transferido el embrión, mediante ultrasonografía (Easote, Italia), con frecuencia de 7,5 MHz.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis del efecto del estadio embrionario sobre la tasa de gestación en receptoras se utilizó la prueba t de Student ( $p < 0,05$ ).

### **Resultados**

Se realizaron 10 transferencias de embriones bipartidos frescos en receptoras cruzadas resultando preñadas el 60%: en el caso de transferencia de mórulas se transfirieron 5 embriones bipartidos logrando preñar 3 (60%), gestaciones gemelares; en blastocitos 5 transferidos logrando preñar 0 (0%); los resultados indican diferencia estadística significativa  $p < 0,05$  (Tabla 2).

**Tabla 2.** Diferencia del porcentaje de gestación de embriones bipartidos entre los estadios de mórula y blastocisto en ganado bovino.

Estadios	n°	Tasa de preñeces dobles n (%)
Mórula	5	3 (60) <sup>a</sup>
Blastocisto	5	0 (0) <sup>b</sup>

a - b / Letras diferentes en sentido vertical, indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura.** Gemelos homocigóticos de la raza Angus, producidos por bipartición embrionaria.

### **Discusión**

En la década del 70 se pensaba que los embriones en fases tempranas de la segmentación no sobrevivirían después de una microcirugía <sup>(15)</sup>. Fue en los años ochenta cuando se demostró que las mórulas y blastocistos de los animales domésticos eran capaces de desarrollarse después de una partición y producir nacimientos viables <sup>(11)</sup>. Actualmente la partición de embriones permite

la producción de gemelos idénticos al dividir el embrión original por métodos microquirúrgicos, con ayuda de un micromanipulador. Sin embargo, en nuestro trabajo los embriones fueron bisectados manualmente, lo que sugiere su aplicabilidad con equipamiento mínimo bajo condiciones de campo. Las tasas de producción de gemelos homocigóticos van desde poco más de 30% en bovinos y ovinos <sup>(3, 5, 13)</sup>, siendo hasta casi 70% en bovinos, con porcentajes de gestación superiores a 60% <sup>(11)</sup> e incluso, en algunos casos, equivalentes a 100% <sup>(14)</sup>. En nuestro trabajo, se transfirieron 10 hemi-embriones, obteniéndose una tasa de preñeces dobles de los hemi-embriones del 60% para el caso de mórula, similar a lo previamente reportado. No obstante, la causa referente a la ventaja que tiene el estadio de mórula comparado al de blastocisto requiere de mayores estudios.

Este trabajo genera la posibilidad de ser replicado trayendo consigo múltiples ventajas tales como la producción de gemelos idénticos; evita la aparición de freemartinismo, disposición de blastómeras desprendidas para el sexaje previo de embriones, generación de gemelos idénticos para trabajos de investigación, provisión de material para pruebas genómicas de los futuros terneros, entre otros.

## Conclusión

La producción artificial de gemelos homocigóticos puede realizarse con equipamiento mínimo bajo condiciones de campo a partir de embriones en estadio de mórula. Futuros trabajos que incluyan un mayor número de embriones, deberán confirmar los resultados preliminares obtenidos en este experimento.

## Bibliografía

1. Agca, Y., Monson, R.L., Northey, D.L., Peschel, D.E., Schaefer, D.M., Rutledge, J.J.: 1998. Normal calves from transfer of biopsed, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* 50: 129-145.
2. Chesta, P. 2010. Sincronization of ovulation, fertilization rates and embryo quality in bovine embryo donors. M.Sc. Thesis, National University of Cordoba, Argentina; 2010. (Published in Spanish).
3. Edwards, R.G., Beard, H. K. 1998. How identical would cloned children be? An understanding essential to the ethical debate. *Hum. Reprod. Update* 4:791-811.
4. Gray, K.G., Bondioli K.R., Betts C.L. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 35: 37-44.
5. Heyman, Y., Vignon, X., Chesné, P., Le Bourhis, D., Marchal, J., Renard, J.P. 1998. Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:595603.
6. Illmensee, K; Kaskar, K y Zavos, P. 2005. Efficient blastomere biopsy for mouse embryo splitting for future applications in human assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol 11. No 6. 2005 716-725.
7. International Embryo Transfer Society, Manual, IETS 2010. Pg. 67-70.
8. Merchant, H. 1997. Clonación en mamíferos: bases biológicas e implicaciones teóricas, prácticas y éticas. *Ciencia* 48:49-57.
9. Navarro, M. y col. 2003, Técnicas de Clonación de embriones, Ciencias Veterinarias.
10. Rexroad, C.E., Powell, A.M. 1987. Culture of blastomeres from *in vitro*-matured, fertilized, and cultured bovine embryos. *Molec. Reprod. Dev.* 48:238- 245.
11. Rorie, R.W., Godke, R.A. 1987. Bisection of bovine embryos. In: *Embryo technologies to domestic animals* T. Greve, editor. Codenhagen. 1-9.
12. Vajta, G, Lewis, I.M., Trounson, A.O., Purup, S., Maddox-Hyttel, P, Schmidt, M., Pedersen, H.G., Greve, T, Callesen, H. 2003. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. *Biol. Reprod.* 68:571-8.
13. Williams, T.J., Elsdén, R.P., Seidel, G.E. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 22: 521-531.
14. Williams, T.J., Elsdén, R.P., Seidel, G.E. 1983. Bisecting bovine embryos: methods, applications and success rates. *Proceedings of the Animal Conference on Artificial Insemination and Embryo Transfer in Beef Cattle*. Denver, CO, USA pp. 45-51.
15. Willadsen, S.M., Godke, R.A. 1984. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.* 114: 240-243.